

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

(51) Internationale Patentklassifikation 6: C23C 18/52	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/48837 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. Dezember 1997 (24.12.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/01236 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Juni 1997 (18.06.97) (30) Prioritätsdaten: 196 24 332.7 19. Juni 1996 (19.06.96) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: HOFINGER, Jürgen [AT/DE]; Gubener Strasse 28, D-01237 Dresden (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WAHL, Reiner [DE/DE]; Heckenweg 22, D-01257 Dresden (DE). KIRSCH, Remo [DE/DE]; Bernhardstrasse 44, D-01187 Dresden (DE). MERTIG, Michael [DE/DE]; Muldaer Strasse 22, D-01189 Dresden (DE). POMPE, Wolfgang [DE/DE]; Buchenweg 15, D-01737 Kurort Hartha (DE). UNGER, Eberhard [DE/DE]; Otto-Devrient-Strasse 19, D-07743 Jena (DE). (74) Anwälte: UHLEMANN, Henry usw.; Postfach 270 139, D- 01171 Dresden (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: METALLIC NANOSTRUCTURE ON THE BASIS OF SELF-ASSEMBLING, GEOMETRICALLY HIGHLY-ORDERED PROTEINS, AND PROCESS FOR PREPARATION THEREOF (54) Bezeichnung: METALLISCHE NANOSTRUKTUR AUF DER BASIS SELBSTASSEMBLIERTER, GEOMETRISCH HOCHGEORDNETER PROTEINE SOWIE VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG (57) Abstract The invention relates to metallic nanostructures on the basis of self-assembled, geometrically highly-ordered proteins, and a process for the preparation thereof. Proteins which, during the process of self-assembly, form highly-ordered two or three-dimensional structures such as bacterial cell coat proteins, collagen, actin filaments and tubulin filaments and DNA strands, are therefore considered to be geometrically highly ordered proteins. According to the invention, the assembled proteins are activated with a metal solution and subsequently are subjected to electroless metal-plating in a metallising bath under conditions tolerable for proteins. The proteins can be partially or fully metal plated. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft metallische Nanostrukturen auf der Basis selbstassemblierter, geometrisch hochgeordneter Proteine sowie ein Verfahren zu deren Herstellung. Unter geometrisch hochgeordneten Proteinen werden dabei Proteine verstanden, die im Prozeß der Selbstassemblierung hochgeordnete zwei- bzw. dreidimensionale Strukturen bilden, wie bakterielle Zellhüllenproteine, Kollagen, Actin- und Tubulinfilamente und DNA-Stränge. Erfindungsgemäß werden die assemblierten Proteine mit einer Metalllösung aktiviert und anschließend stromlos in einem Metallisierungsbath unter für Protein verträglichen Bedingungen metallisiert. Die Proteine können teilweise oder vollständig metallisiert sein.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Metallische Nanostruktur auf der Basis selbstassemblierter, geometrisch hochgeordneter Proteine sowie Verfahren zu deren Herstellung

Die Erfindung betrifft metallische Nanostrukturen auf der Basis selbstassemblierter, geometrisch hochgeordneter Proteine sowie ein Verfahren zu deren Herstellung auf der Basis der stromlosen Metallabscheidung auf elektrischen Isolatoren aus der wäßrigen Lösung. Die Voraussetzung bezüglich des Proteins bestehen darin, daß das Protein in einem Selbstassemblierungsprozeß reproduzierbar, geometrisch hochgeordnete Strukturen bildet, die sich durch eine charakteristische Dimension (D) beschreiben lassen. Bei zylindrischen Strukturen bedeutet dies identische Durchmesser und bei zweidimensionalen Proteinstrukturen identische Periodizität des Proteinkristalls.

So gewonnene Strukturen mit charakteristischen Dimensionen im Nanometerbereich weisen neue physikalische Eigenschaften auf und besitzen deshalb ein weites Anwendungsgebiet. Dabei ist nicht nur die Ausnutzung spezifischer elektrischer und magnetischer Eigenschaften wichtig. Die metallischen Nanostrukturen sind als mechanische Bauteile auf dem Gebiet der Mikrosystemtechnik anwendbar. Beispielsweise können derartige Strukturen als Sonden für die Atomkraftmikroskopie, Rastertunnelmikroskopie, Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie und Feldemissions-Transmissionselektronenmikroskopie verwendet werden.

Aus der US-PS 4 911 981 ist ein Verfahren zur Erzeugung von Mikrostrukturen auf der Basis von Lipidstrukturen bekannt. Die Möglichkeit der Erzeugung von Feldemissionskathoden mit nach diesem Verfahren hergestellten Lipidröhren wird in der US-PS 5 089 742 näher erläutert. Der Nachteil dieser Lipidröhren besteht unter anderem in deren Dimension. Die beschriebenen Phospholipidstrukturen haben einen Außendurchmesser von 500 nm bis 1 µm, was die Herstellung von Strukturen mit kleinerem Durchmesser unmöglich macht. Desweiteren wird eine starke Streuung der Durchmesser der erzeugten Filamente beobachtet. Das in der US-PS 4 911 981 beschriebene Verfahren beschränkt sich nur auf makromolekulare Lipidstrukturen, die gegenüber der Variation ihrer Umgebungsbedingungen wie z. B. Temperatur und pH-Wert relativ beständig sind. Aus diesem Grunde ist ihre Beschichtung aus der wäßrigen Lösung leicht zu realisieren durch die direkte Anwendung der

für die stromlose Metallisierung von Isolatoren/Plasten entwickelten und bei *Brenner, A. und Riddell, G., Proc. Am. Electroplaters' Soc., 34, 156, 1947* oder bei *Charles, R.; Shipley, Jr., „Historical Highlights of electroless plating“, Plating and Surface Finishing, 92-99, 1984* beschriebenen Verfahren. Ganz allgemein wird auf die Möglichkeit der Erzeugung metallischer Nanostrukturen auf der Basis biologischer Objekte in der Arbeit von Douglas, K.; Devaud, G.; Lyon, M.; Clark, N., „Nanostructure fabrication using biomolecular templates“, NATO ASI Ser., Ser. C 1183-1191, 1992 eingegangen. In einem deutschen Patent DE 40 38 887 A1 ist ein Verfahren zur Herstellung von Kollagenpartikeln als Wirkstoffträger bekannt. Der Aufbau von Nanostrukturen durch äußere stromlose Metallisierung mit elektrischen oder magnetischen Schichten wird hierbei nicht in Betracht gezogen.

Die Aufgabe der Erfindung besteht deshalb in der Schaffung von Metallstrukturen mit charakteristischen Strukturen im Nanometerbereich.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch eine metallische Nanostruktur gelöst, die aus einem metallisierten, selbstassemblierten, geometrisch hochgeordneten Protein besteht. Dabei kann das Protein teilweise oder vollständig metallisiert sein.

Unter geometrisch hochgeordneten Proteinen werden dabei Proteine verstanden, die im Prozeß der Selbstassemblierung hochgeordnete zwei- bzw. dreidimensionale Strukturen bilden, wie bakterielle Zellhüllenproteine, Kollagen, Actin- und Tubulinfilamente und DNA-Stränge (Desoxyribonukleinsäure).

Die erfindungsgemäßen metallischen Nanostrukturen mit vollständiger Metallisierung weisen eine homogene Metallphase auf, in die Keimbildungszentren eines anderen Metalls eingearbeitet sind. Vorzugsweise bestehen dabei die Keimbildungszentren aus Edel- oder Schwermetallen, wie z. B. Gold, Platin, Palladium, Titan oder Zirkonium und die homogene Metallphase aus Nickel oder Kupfer oder Cobalt. Die morphologisch konforme Metallschicht besitzt einer Dicke von 1 nm bis zur charakteristischen Dimension (D) des Proteins. Die Metallschicht ist elektrisch leitend, weist im Fall einer Nickel oder Cobaltbeschichtung magnetische Eigenschaften auf und kann prinzipiell zum weiteren Aufbau von Heterostrukturen (Isolatoren, Halbleiter, Metalle und Keramiken) benutzt werden.

Erfindungsgemäß können die metallischen Nanostrukturen auch nur eine teilweise Metallisierung aufweisen. Die teilweise Metallisierung kann dabei aus einer Metallphase, in die Keimbildungszentren eines anderen Metalls eingearbeitet sind, oder nur aus Keimbildungszentren bestehen. Vorzugsweise bestehen dabei die Keimbildungszentren aus Edel- oder Schwermetallen, wie z. B. Gold, Platin, Palladium, Titan oder Zirkonium und die Metallphase aus Nickel oder Kupfer oder Cobalt.

In einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung besteht das selbstassemblierte, geometrisch hochgeordnete Protein aus einer Tubulin enthaltenden Struktur, vorzugsweise Mikrotubuli. Bei Mikrotubuli handelt es sich um eine Filamentstruktur mit einem Außendurchmesser von rund 25 nm und mehreren Mikrometern Länge, die im Cytoskelett von eukaryontischen Zellen vorkommen. Die erfindungsgemäßen metallisierten Mikrotubuli bilden metallische Röhren mit einem Durchmesser von 30 nm bis zu 200 nm, je nachdem wieviel Metall auf den Tubulin enthaltenden Strukturen abgeschieden wird. Auch eine teilweise Beschichtung ist möglich.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung besteht das selbstassemblierte, geometrisch hochgeordnete Protein aus bakteriellen Zellhüllenproteinen. Bei bakteriellen Zellhüllenproteinen, auch als S-Layer (surface layer) bezeichnet, handelt es sich um zweidimensionale Proteinkristalle, die bei vielen Bakterien die äußere Zellwandschicht bilden. Diese aus nur einem Protein oder Glycoprotein bestehenden S-layer besitzen die Fähigkeit, in vitro in monomolekulare Gitter zu assemblieren. Die Einheitszellengröße der Gitter variiert je nach S-Layer Typ zwischen 10 bis 40 nm, wobei eine Einheitszelle abhängig von der Symmetrie des Gitters (z. B. quadratisch oder hexagonal) aus mehreren Monomeren bestehen kann.

Die erfindungsgemäß verwendeten S-Layer bilden vorzugsweise die Grundlage für eine periodische Anordnung von metallischen Partikeln mit Durchmessern zwischen 0,5 bis 20 nm, je nachdem nach welcher Reaktionsdauer der Prozeß der Metallabscheidung abgebrochen wird. Die periodische Anordnung der metallischen Partikel wird dabei bestimmt durch die

Symmetrie des S-Layers, seine Gitterperiodizität und die Dichte der reaktiven Zentren je Proteinmonomer.

Erfindungsgemäß werden metallische Nanostrukturen auf der Basis selbstassemblierter, geometrisch hochgeordneter Proteine so hergestellt, daß assemblierte, hochgeordnete Proteine mit einer Metalllösung aktiviert und anschließend stromlos in einem Metallisierungsbad unter für Protein verträglichen Bedingungen metallisiert werden. Soll nur eine teilweise Metallisierung realisiert werden, ist die Aktivierung mit einer Metalllösung ausreichend. Möglich ist es aber auch, die aktivierten Proteine begrenzt in einem Metallisierungsbad stromlos zu beschichten.

In einer Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens können die hochgeordneten Proteine in vitro zusätzlich assembliert werden. Die erfindungsgemäße Aktivierung der Proteine erfolgt mit einer Edelmetall- oder Schwermetalllösung, z. B. mit einer Au-, Pt- oder Pd-Ionen enthaltenden Lösung.

Die stromlose Metallisierung wird nach einer Ausgestaltung der Erfindung mit einem Ni- oder Cu- oder Co-Metallisierungsbad auf der Basis von Dimethylaminoboran als Reduktionsmittel und Ni- oder Cu-, oder Co-Salzen durchgeführt. Vorteilhaft kann auch Hypophosphit als Reduktionsmittel verwandt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Mikrotubuli metallisiert. Deren Isolation und Reinigung ist bei *Shelanski, M.; Gaskin, F.; Cantor, C., „Mikrotubule assembly in the absence of added nuclotides“, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 765-768, 1973* und *Vater, W.; Böhm, K.; Unger, E., „Effects of DNA on the taxo stimulated in vitro assembly of microtubule protein from porcine brain“, Studio Biophys. 97, 47-60, 1983* ausführlich beschrieben. Die Mikrotubuli werden in vitro mit GTP (Guanosin-5'-Triphosphat Trinatriumsalz Monohydrat) und Taxol (aus *Taxus brevifolia*) bei 37 °C assembliert und weitgehend vom nicht assemblierten Protein getrennt.

Die Aktivierung der assemblierten Mikrotubuli erfolgt erfindungsgemäß so, daß den assemblierten Mikrotubuli eine gesättigte Pd-Acetatlösung zugesetzt wird und diese Lösung zur Ausbildung von Pd-Keimen auf der Oberfläche der Mikrotubuli führt. Vorteilhaft kann in

diesem Prozeß neben der Adsorption von in der Aktivierungslösung gebildeten Pd-Partikeln an der Oberfläche der Mikrotubuli die Fähigkeit der die Tubulinstruktur bildenden Aminosäuregruppen zur Reduktion von Pd^{2+} zu Pd^0 genutzt werden. Bei diesem Prozeß entstehen auf der Oberfläche der Mikrotubuli Pd-Cluster, deren Größe und Verteilung von der Länge des Aktivierungsprozesses abhängt. Bei einer mittleren Clustergröße von 2 nm ist auch eine Aktivierung der inneren Oberfläche der Mikrotubuli möglich. Vorteilhaft wird der Aktivierungsprozeß für die Dauer von 2 h geführt. Die aktivierten Mikrotubuli werden anschließend von der Aktivierungslösung getrennt, gewaschen und in eine Pufferlösung überführt.

An die Aktivierung schließt sich die eigentliche Metallisierung an. Die gebräuchlichsten Metallisierungsbäder für Kupfer und Nickel arbeiten bei Temperaturen über 60 °C und einem pH-Wert größer 8 (siehe Charles, R.; Shipley, Jr., „*Historical Highlights of electroless plating*“, *Plating and Surface Finishing*, 92-99, 1984 und Lang, K., „*Die stromlose Vernickelung*“, *Galvanotechnik* Nr. 6, 347-358, 1965). Um eine stromlose Beschichtung auf den aktivierten Proteinstrukturen zu realisieren, müssen aber die Beschichtungsbedingungen an die sehr empfindlichen Assemblierungsbedingungen der Proteinstrukturen angepaßt werden, damit während der Metallisierung das biomolekulare Templat nicht zerfällt bzw. dessen Morphologie nicht wesentlich gestört wird.

Die in vitro vorliegenden aktivierten Mikrotubuli werden mit einem Ni-Bad auf der Basis von Dimethylaminoboran als Reduktionsmittel und Ni-Acetat oder Ni-Sulfat als zu reduzierendes Metallsalz versetzt. Aus dieser Lösung scheiden nach einer Dauer von ca. 1 min die metallisierten Mikrotubuli aus. Die abgeschiedene Nickelschicht ist bei einer Schichtdicke von rund 10 nm auf den Mikrotubuli geschlossen und zeigt neben elektrischen auch magnetische Eigenschaften. Die Dicke der erzeugten Metallschichten, die bei pH zwischen 6,2 und 7,0 und Temperaturen zwischen 22 °C und 37 °C abgeschieden werden, hängt von der Dauer des Metallisierungsprozesses ab. Es sind neben sehr dünnen Metallschichten (Dicke rund 10 nm) auch Schichten von mehreren 100 nm Schichtdicke auf der Oberfläche der Mikrotubuli realisierbar, wobei die Ausgangsmorphologie der einzelnen Mikrotubuli erhalten bleibt.

Aufgrund dessen, daß die eingesetzten Mikrotubuli einen sehr kleinen Durchmesser von 25 nm besitzen, ist es möglich, metallische Röhren zu erzeugen, die einen Durchmesser von 35 nm bis zu einigen 100 nm besitzen, je nachdem wieviel Metall auf den Mikrotubuli abgeschieden wird. Da die eingesetzten Mikrotubuli in ihrem Durchmesser gleich sind, gibt es zwischen den einzelnen metallisierten Strukturen keine Unterschiede bezüglich deren Durchmesser, was gleiche elektrische und magnetische Eigenschaften zur Folge hat. Des weiteren besitzen die Mikrotubuli eine Länge von mehreren Mikrometer und somit ein großes Aspektverhältnis (Länge : Breite). Dies macht sie für Anwendungen, in denen es auf eine Positionierung und Fixierung der Metallröhrchen ankommt, besonders geeignet.

Das beschriebene Verfahren der Aktivierung und Metallisierung ist nicht tubulinspezifisch. Es läßt sich auch auf die anderen erfindungsgemäßen Proteinstrukturen anwenden.

Die Aktivierung der Proteine kann nach einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens auch so erfolgen, daß z. B. nach der Reinigung erhaltene S-Layer der *Sporosarcina ureae* entweder mit einer K_2PtCl_4 Lösung versetzt werden oder daß die S-Layer zuvor wie bei Pum, D.; Weinhandl, M.; Hödl, C.; Sleytr, U., „Large-Scale recrystallization of the S-Layer of *Bacillus coagulans* E38-66 at the air/water interface and on lipid films“, J. Bacteriology, May 2762-2766, 1993 beschrieben, an einer Grenzfläche rekristallisieren und anschließend die Subphase der Rekristallisationslösung durch eine K_2PtCl_4 Lösung ersetzt wird. Je nach Dauer der Reaktionszeit kommt es zur Bildung von Pt-Cluster auf der Oberfläche der S-Layer. Vorteilhaft kann in diesem Prozeß der Pt^{2+} -Reduktion zu Pt^0 neben dem im Fall der Aktivierung der Mikrotubuli angegeben reduzierenden Wirkung bestimmter Aminosäuren und der Reduktion des Pt-Salzes durch in der Lösung enthaltende Zusätze wie NaN_3 , die spezifischen Absorption der Pt-Cluster auf Grund der ausgeprägten Ladungsverteilung auf dem S-Layer genutzt werden.

Die so erhaltenen regelmäßigen Anordnungen von Pt-Cluster mit einer Größe von 1 bis 2 nm sind vor allem hinsichtlich der Anwendung der katalytischen Aktivität der abgeschiedenen Cluster interessant. Zudem kann auch wie im Ausführungsbeispiel für die Metallisierung der Mikrotubuli angegeben, durch stromlose Metallisierung ein kontinuierlicher Metallfilm abgeschieden werden.

Anhand nachfolgender Ausführungsbeispiele und beigefügter Abbildungen soll die Erfindung näher erläutert werden. Dabei zeigen:

Abb. 1 REM-Aufnahme metallisierter Mikrotubuli

Abb. 2 TEM-Aufnahme aktivierter S-Layer der *Sporosarcina ureae*

Ausführungsbeispiel 1

Beschrieben wird die Herstellung von dreidimensionalen Metallstrukturen auf der Basis von Mikrotubulitemplaten. Zunächst werden die Mikrotubuli wie folgt assembliert:

Die Isolation und Reinigung von Tubulin ist bei *Shelanski, M.; Gaskin, F.; Cantor, C.*, „*Mikrotubule assembly in the absence of added nucleotides*“, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 765-768, 1973 und *Vater, W.; Böhm, K.; Unger, E.*, „*Effects of DNA on the taxo stimulated in vitro assembly of microtubule protein from porcine brain*“, *Studio Biophys.* 97, 47-60, 1983 ausführlich beschrieben. Die Assemblierung von Mikrotubuli aus einer Tubulinpräparation mit einer Konzentration von 1 mg/ml Tubulin erfolgt in einer Pufferlösung von 500 mM MES (2-Morpholinoethansulfonsäure Monohydrat), 1 mM EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-Aminoethyl)-Tetraessigsäure) und 0,5 mM $MgCl_2$ durch Zugabe von 0,25 mM GTP und 10 μ M Taxol bei einer Temperatur von 37 °C. Um die Assemblierung zu verfolgen, wird die Trübung der Assemblierungslösung mit einem Spektrometer bei einer Wellenlänge von 350 nm aufgezeichnet, bis eine Sättigung zu beobachten ist. Danach wird die Lösung bei 14000 Umdrehungen/Minute 30 min zentrifugiert um die assemblierten Mikrotubuli und das nicht assemblierte Protein zu trennen. Der so erhaltene Bodensatz wird wieder in einen MES Buffer bei pH = 6,8 überführt. Die so erhaltene Präparation ist Ausgangspunkt für alle weiteren Aktivierungs- und Metallisierungsschritte.

Ein Volumen von 300 μ l dieser Lösung mit den assemblierten Mikrotubuli wird zum Zweck der Aktivierung der Mikrotubulioberfläche mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Palladiumacetatlösung versetzt. Im Aktivierungsprozeß wird diese Lösung stengelassen, bis eine ausreichende Anzahl von Pd-Keimen auf den Mikrotubuli entstehen (ca. 2 h). Danach

werden die aktivierten Mikrotubuli mit MES-Puffer unter der Verwendung eines 300 kDa Membranfilters zweimal gewaschen. Der erzeugte Rückstand im Membranfilter wird in 500 µl MES-Puffer überführt.

Bei der Untersuchung dieser Probe im Transmissionselektronenmikroskop ist deutlich die Anlagerung von schwarzen Partikeln an der Oberfläche der Mikrotubuli sichtbar. Der Durchmesser der Partikel lag bei 2 Stunden Aktivierung bei rund 2 nm. Hier muß angemerkt werden, daß es für das Beschichtungsverfahren nicht wesentlich ist, ob die angelagerten Palladiumcluster bereits in reduzierter Form oder noch als Pd^{2+} -Ionen vorliegen, die dann erst in der Startphase der Metallisierung im Dimethylaminoboranbad reduziert werden. Mit einem energiedispersiven Röntgenmikrobereichsanalysator wurde die Zusammensetzung dieser Cluster bestimmt und festgestellt, daß sie zu 99 % aus Palladium bestehen.

Die so erhaltenen Mikrotubuli mit Pd^0 - bzw. Pd^{2+} -Cluster auf der Oberfläche können stromlos beschichtet werden. Hierzu wird ein Nickelbad der folgenden Zusammensetzung verwendet:

50 g/l $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

25 g/l Natriumcitrat

25g/l 85%-ige Milchsäure

2,5 g/l Dimethylaminoboran.

Der pH-Wert dieses Metallisierungsbades wird mit NH_4OH auf einen Wert von 6,8 eingestellt.

500 µl der Lösung mit den aktivierten Mikrotubuli werden mit der gleichen Menge des oben beschriebenen Metallisierungsbades versetzt. Nach rund 1 min fallen aus dieser Lösung schwarze Partikel, die die metallisierten Mikrotubuli darstellen, aus. Der weiterlaufende Metallisierungsprozeß läßt sich durch starkes Verdünnen der Lösung mit MES-Puffer abbrechen. Auf diese Weise können Mikrotubuli mit verschiedenen Metallfilmdicken erzeugt werden.

Die nickelmetallisierten Mikrotubuli wurden im Transmissionselektronenmikroskop und Rasterelektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 1 kV untersucht. Eine entsprechende Aufnahme ist in Abb. 1 dargestellt. Die abgeschiedenen Ni-Partikel besitzen

eine Größe von rund 8 - 10 nm, die bei einer Schichtdicke ab 10 nm einen geschlossenen, elektrisch leitenden Film bilden. Ersichtlich ist, daß die Metallisierung nur an mit Pd-Keimen besetzten Stellen der Mikrotubuli beginnt. Das bedeutet, eine Abscheidung von Nickel aus der Metallisierungslösung ist nur nach einer Aktivierung der Mikrotubulioberfläche mit Katalysatorkeimen möglich.

Der magnetische Charakter der Nickelbeschichtung konnte durch Manipulation der metallisierten Mikrotubuli in wäßriger Lösung mit Hilfe eines elektromagnetischen Feldes und durch magnetische Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen werden.

Ausführungsbeispiel 2

Die Assemblierung der Mikrotubuli und deren Aktivierung wird wie im Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Im Gegensatz zum Beispiel 1 wird Nickel aus einem Nickelsulfatkomplex abgeschieden. Die Zusammensetzung des Metallisierungsbades ist wie folgt:

39,4 g/l $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

20 g/l Natriumcitrat

10g/l 85%-ige Milchsäure

4g/l Dimethylaminoboran.

Die pH-Wert Einstellung von 6,8 erfolgt ebenfalls mit NH_4OH . Die Abscheideraten dieses Bades liegen in der gleichen Größenordnung wie die des Bades im Beispiel 1, so daß eine Beschichtung von rund 1 min Dauer für die Erzeugung einer kontinuierlichen Ni-Schicht auf den Mikrotubuli ausreicht.

Der magnetische Charakter der Nickelbeschichtung konnte, wie in Ausführungsbeispiel 1 dargelegt, nachgewiesen werden.

Ausführungsbeispiel 3

Die Assemblierung der Mikrotubuli und deren Aktivierung wird wie im Beispiel 1 beschrieben durchgeführt. Im Gegensatz zum Beispiel 1 wird statt Nickel eine Cobaltschicht auf den aktivierten Mikrotubuli abgeschieden. Die Zusammensetzung des Metallisierungsbades ist wie folgt:

25g/l $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

25g/l Bernsteinsäure

4g/l Dimethylaminoboran

Der pH-Wert des Bades wird mit NH_4OH auf 6.8 eingestellt. Die Abscheiderate dieses Bades ist etwas um den Faktor 2 geringer als die Abscheideraten der Ni-Bäder, so daß eine Beschichtungsdauer von rund 2min für die Erzeugung einer kontinuierlichen Co-Schicht auf den Mikrotubuli ausreicht.

Der magnetische Charakter der Cobaltbeschichtung konnte wie in Ausführungsbeispiel 1 dargelegt nachgewiesen werden.

Ausführungsbeispiel 4

Die Assemblierung der Mikrotubuli wird wie im Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

Zum Zweck der Aktivierung der Mikrotubulioberfläche wird ein Volumen von 300 μl assemblierter Mikrotubuli mit einer 3 mM K_2PtCl_4 -Lösung oder einer 3 mM Na_2PdCl_4 -Lösung versetzt. Das Gesamtvolumen der Aktivierungslösung wird auf 1000 μl mit MES-Puffer aufgefüllt. Im Aktivierungsprozeß wird diese Lösung stehengelassen, bis eine ausreichende Anzahl von Pt- bzw. Pd-Keimen auf den Mikrotubuli entstanden sind (ca. 2h). Danach erfolgt die Filtration der aktivierten Mikrotubuli wie im Ausführungsbeispiel 1 angegeben.

Die anschließende Metallisierung wird analog zum Ausführungsbeispiel 1 durchgeführt.

Ausführungsbeispiel 5

Beschrieben wird die Herstellung einer zweidimensionalen regelmäßigen Anordnung von Pt-Cluster auf der Oberfläche des S-Layer Proteins *Sporosarcina ureae*.

Die Isolation und Reinigung des S-Layerproteins ist bei Engelhard H.; Saxton, W.; Baumeister, W., „Three-dimensional structure of the tetragonal surface layer of *Sporosarcina ureae*“, J. Bacteriology, Oct. 309-317, 1986 ausführlich beschrieben. Die so enthaltenen S-layersheets werden in einer 50mM Phosphatpufferlösung (pH 7,8) mit 1mM $MgCl_2$ bei 4°C gelagert. Um das Bakterienwachstum in der Proteinlösung zu unterbinden und als zusätzliches Reduktionsmittel für die Aktivierungsreaktion hat sich ein Zusatz von 3mM NaN_3 als hilfreich erwiesen. Diese S-Layer Lösung mit einer Proteinkonzentration von 10mg/ml ist Ausgangspunkt für alle weiteren Aktivierungsschritte.

Ein Volumen von 30 μ l dieser Proteinlösung wird mit einer 3mM K_2PtCl_4 Lösung, die ein Tag zuvor angesetzt wurde, versetzt. Das Gesamtvolumen der Aktivierungslösung beträgt 1ml. Die Aktivierungslösung wird 24h stehen gelassen bis eine ausreichende Anzahl von Pt-Clustern auf der S-Layer Oberfläche entstanden sind. Danach werden die aktivierten S-Layer mit Phosphatpuffer unter Verwendung eines 300kDa Membranfilters gewaschen. Der erzeugte Rückstand im Membranfilter wird in 500 μ l Phosphatpuffer überführt.

Zur Untersuchung der Proben werden die aktivierten S-Layer auf einem Transmissionselektronenmikroskop-Grid immobilisiert. Die transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme in Abbildung 2 zeigt deutlich die Ablagerung von Pt-Cluster mit einem mittleren Durchmesser von 1,5 nm. Weiterhin erkennt man deutlich, die periodische Anordnung der Pt-Cluster, die sich an der vielzähligen Symmetrie des S-Layers *Sporosarcina ureae* orientieren. Der mittlere Abstand zwischen den Pt-Cluster von rund 3 nm, läßt den Schluß zu, daß pro Einheitszelle 4 Pt-Cluster abgeschieden wurden. Die chemische Zusammensetzung der abgeschiedenen Cluster wurde mittels einer energiedispersiven Röntgenmikrobereichsanalyse mit 99 % Platin bestimmt.

Patentansprüche:

1. Metallische Nanostruktur, bestehend aus einem metallisierten, selbstassemblierten, geometrisch hochgeordneten Protein.
2. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das selbstassemblierte hochgeordnete Protein teilweise oder vollständig metallisiert ist.
3. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das selbstassemblierte, geometrisch hochgeordnete Protein eine Tubulin enthaltende Struktur oder ein bakterielles Zellhüllenprotein oder ein Kollagen oder ein Actinfilament oder ein DNA-Strang ist.
4. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das selbstassemblierte geometrisch hochgeordnete Protein ein Mikrotubuli ist.
5. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das selbstassemblierte geometrisch hochgeordnete Protein ein S-Layer ist.
6. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das selbstassemblierte geometrisch hochgeordnete Protein ein S-Layer der *Sporosarcina ureae* ist.
7. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die selbstassemblierten, geometrisch hochgeordneten Proteine mit vollständiger Metallisierung eine Metallisierung aus einer homogenen Metallphase aufweisen, in die Keimbildungszentren eines anderen Metalles eingebettet sind.
8. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die selbstassemblierten, geometrisch hochgeordneten Proteine mit teilweiser Metallisierung eine Metallisierung aus einer Metallphase, in die Keimbildungszentren eines anderen Metalles eingebettet sind, oder Keimbildungszentren eines Metalles aufweisen.

9. Metallische Nanostruktur nach Anspruch 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Keimbildungszentren aus Edelmetallen oder Schwermetallen und die Metallphase aus Kupfer oder Nickel oder Cobalt besteht.
10. Verfahren zur Herstellung metallischer Nanostrukturen auf der Basis selbstassemblierter, geometrisch hochgeordneter Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine mit einer Metalllösung aktiviert und anschließend stromlos in einem Metallisierungsbad unter für Protein verträglichen Bedingungen metallisiert werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als selbstassemblierte, geometrisch hochgeordnete Proteine Tubulin enthaltende Strukturen oder bakterielle Zellhüllenproteine oder Kollagen oder Actinfilamente oder DNA-Stränge eingesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als selbstassemblierte, geometrisch hochgeordnete Proteine Mikrotubuli oder S-Layer eingesetzt werden.
13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß als selbstassemblierte geometrisch hochgeordnete Proteine S-Layer des *Sporosarcina ureae* eingesetzt werden
14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die selbstassemblierten geometrisch hochgeordneten Proteine vor der Aktivierung zusätzlich in vitro assembliert werden.
15. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine mit einer Edelmetall- oder Schwermetalllösung aktiviert werden.
16. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine mit einer Palladium- oder Platinsalzlösung aktiviert werden.
17. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine mit einer gesättigten Palladium-Acetatlösung, oder eine K_2PtCl_4 oder eine Na_2PdCl_4 Lösung aktiviert werden.

18. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Metallisierung mit einem Metallisierungsbad auf Basis Dimethylaminoboran als Reduktionsmittel und Nickel- oder Kupfer- oder Cobaltsalzen erfolgt.
19. Verfahren nach Anspruch 10, gekennzeichnet dadurch, daß die Metallisierung mit einem Metallisierungsbad erfolgt, indem Hypophosphit als Reduktionsmittel verwendet wird.
20. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß zur Herstellung metallischer Nanostrukturen mit teilweiser Metallsierung die Proteine mit einer Metalllösung aktiviert werden.

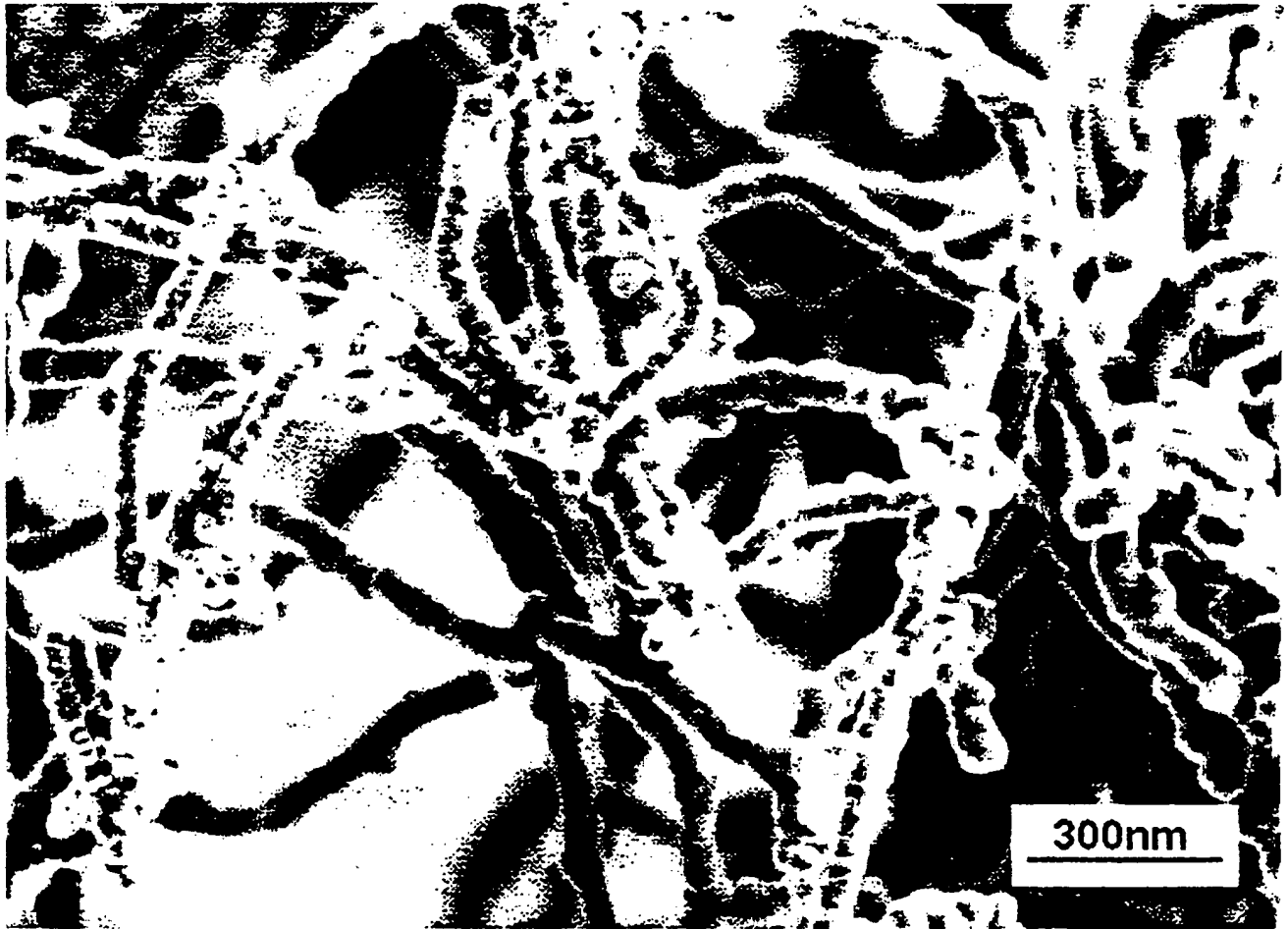


Abbildung 1

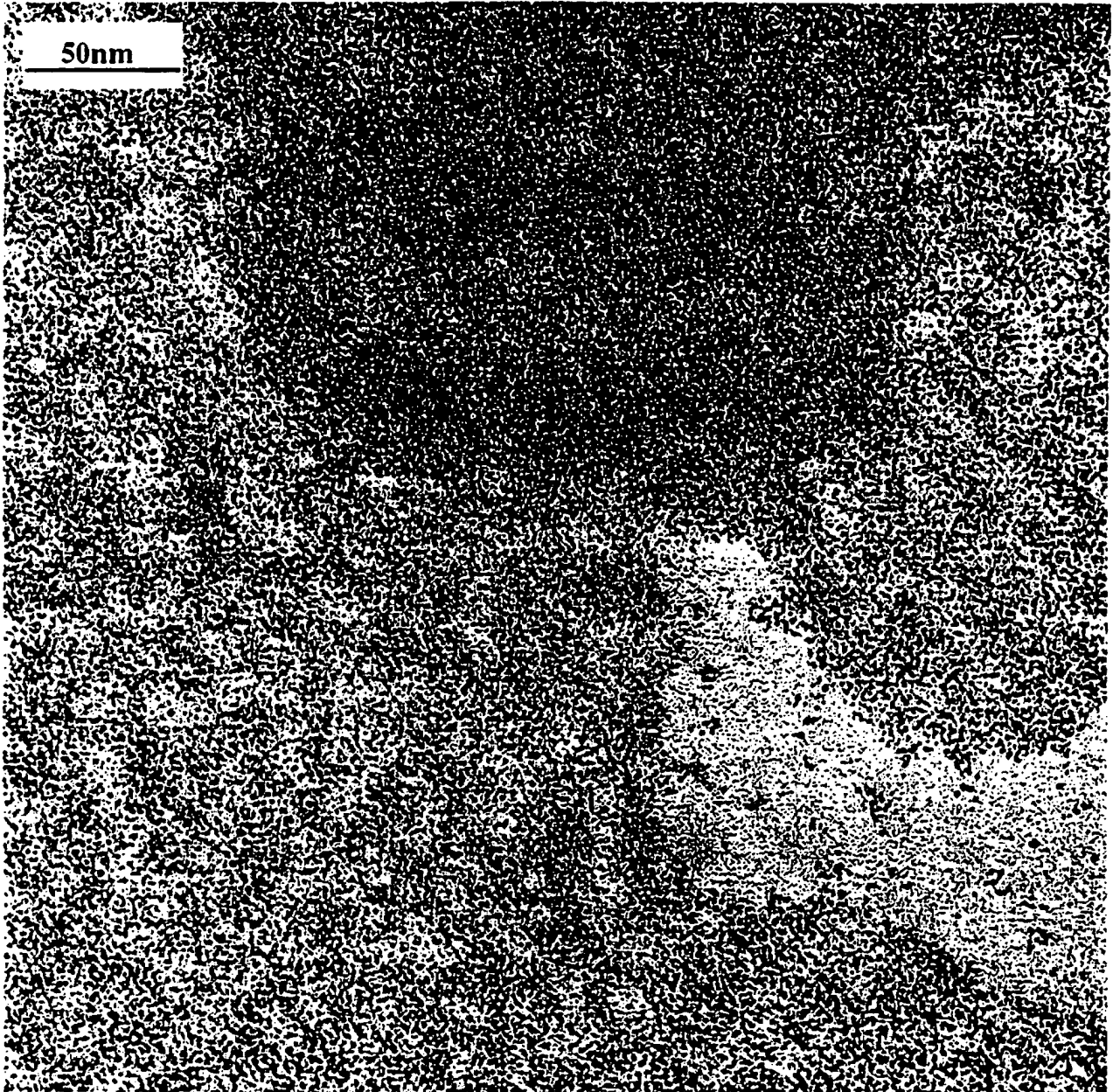


Abbildung 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 97/01236

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶: C23C 18/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶: C23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4911981 A (SCHNUR et al.), 27 March 1990 (27.03.90) the whole document (mentioned in the description). ---	1-20
A	Chem. abstr., Band 118, N° 10, 08 March 1993 (08.03.93) (Columbus, Ohio, USA), page 777, column 2, abstract 9192u, DOUGLAS, K. et al. "Nanostructure fabrication using biomolecular templates", NATO ASI Ser., Ser. C 1992, 374(Phys. Chem. Finite Syst.: Clusters Cryst., Vol 2) 1183-91 (Eng). ---	1-20
A	Chem. abstr., Band 118, N° 18, 03 Mai 1993 (03.05.93) (Columbus, Ohio, USA), page 865, column 1, abstract 181227c, DEVAUD, G. et al. "Microstructural modification by fast atom beam milling of nanotextured ultrathin metal films", J. Vac. Sci. Technol., B 1993, 11(1), 32-6 (Eng).	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 October 1997 (07.10.97)

Date of mailing of the international search report

05 November 1997 (05.11.97)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/01236

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

C 23 C 18/52

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK6

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C 23 C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4911981 A (SCHNUR et al.) 27. März 1990 (27.03.90), ganzes Dokument (in der Beschreibung ge- nannt).	1-20
A	-- Chem. abstr., Band 118, Nr. 10, 08. März 1993 (Co- lumbus, Ohio, USA), Seite 777, Spalte 2, Zusammen- fassungsnr. 91920u, DOUGLAS, K. et al. "Nanostructure fa- brication using biomolecular templates", NATO ASI Ser., Ser. C 1992, 374 (Phys. Chem. Finite Syst.: Clusters Cryst., Vol 2) 1183-91 (Eng). --	1-20

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche
07 Oktober 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05. 11. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.O. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

BECK e.h.

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>Chem. abstr., Band 118, Nr. 18, 03. Mai 1993 (Columbus, Ohio, USA), Seite 865, Spalte 1, Zusammenfassungsnr. 181227c, DEVAUD, G. et al. "Microstructural modification by fast atom beam milling of nanotextured ultrathin metal films", J. Vac. Sci. Technol., B 1993, 11(1), 32-6 (Eng).</p> <p>-----</p>	1-20

ANHANG

zum internationalen Recherchen-
bericht über die internationale
Patentanmeldung Nr.

ANNEX

to the International Search
Report to the International Patent
Application No.

ANNEXE

au rapport de recherche inter-
national relatif à la demande de brevet
international n°

PCT/DE 97/01236 SAE 165348

In diesem Anhang sind die Mitglieder
der Patentfamilien der im obenge-
nannten internationalen Recherchenbericht
angeführten Patentdokumente angegeben.
Diese Angaben dienen nur zur Unter-
richtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family
members relating to the patent documents
cited in the above-mentioned inter-
national search report. The Office is
in no way liable for these particulars
which are given merely for the purpose
of information.

La présente annexe indique les
membres de la famille de brevets
relatifs aux documents de brevets cités
dans le rapport de recherche inter-
national visé ci-dessus. Les renseigne-
ments fournis sont donnés à titre indica-
tif et n'engagent pas la responsabilité
de l'Office.

Im Recherchenbericht
angeführtes Patentdokument
Patent document cited
in search report
Document de brevet cité
dans le rapport de recherche

Datum der
Veröffentlichung
Publication
date
Date de
publication

Mitglied(er) der
Patentfamilie
Patent family
member(s)
Membre(s) de la
famille de brevets

Datum der
Veröffentlichung
Publication
date
Date de
publication

US A 4911981

27-03-90

keine - none - rien

MicroPatent® Document Availability and Pricing

Before you submit your order	<ul style="list-style-type: none">• Check all patent numbers, in all order parts.• Note: Exceptional Order patents are NOT selected by default!• Choose delivery options separately for Standard and Special Collections.
<div style="text-align: center;">Submit Order for the selected patents below.</div> <div>Your reference: <input type="text"/> (optional)</div>	

Standard Collection PatentsDelivery options: Download PDF Format - Complete Documents: Total \$ 0☒ WO9748837 (A1), 22 pagesPreview: MP TIFF PDFMETALLIC NANOSTRUCTURE ON THE BASIS OF SELFASSEMBLING, GEOMETRICALLY HIGHLYORDERED PROTEINS, AND PROCES

[Return to PatentWeb top page](#)[Return to MicroPatent home page](#)info@micropat.com

TRANSLATION

PCT WORLD ORGANIZATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED ACCORDING TO THE TREATY ON
INTERNATIONAL COOPERATION IN THE FIELD OF PATENTS (PCT)

(11) International Publication No. **WO 97/48837**
(51) International Patent Classification⁶: **C23C 18/52 A1**

(43) Int. Disclosure Date: 24 December 1997
(21) Int. File No. PCT/DE97/01236
(22) Int. Application Date: 18 June 1997
(30) Priority data: 196 24 332.7; 19 June 1996; DE

(71) Applicant (for all consenting states except US):
Jurgen Hofinger

(72) Inventor, and
(75) Inventor/applicant (only for US):
Reiner Wahl, Remo Kirsch, Michael Mertig, Wolfgang Pompe, Eberhard Unger

(74) Representative:
Henry Uhlemann et al.

(81) Designated states: CA, JP, US, European patent (AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT
LU MC NL PT SE)

*Published with international search report and will be republished if changes are submitted before
the deadline for amending claims.*

(54) Title:
**METALLIC NANOSTRUCTURE ON THE BASIS OF SELF-ASSEMBLING,
GEOMETRICALLY HIGHLY-ORDERED PROTEINS, AND PROCESS FOR
PREPARATION THEREOF**

(57) Abstract:

The invention relates to metallic nanostructures on the basis of self-assembled, geometrically highly-ordered proteins, and a process for the preparation thereof. Proteins which, during the process of self assembly, form highly-ordered two or three dimensional structures such as bacterial cell coat proteins, collagen, actin filaments and tubulin filaments and DNA strands, are therefore considered to be geometrically highly-ordered proteins. According to the invention, the assembled proteins are activated with a metal solution and subsequently are subjected to electroless metalplating in a metallizing bath under conditions tolerable for proteins. The proteins can be partially or fully metalplated.

Description

The invention concerns metallic nanostructures based on self-assembled geometrically highly-ordered proteins and the process for their production on the basis of currentless metal deposition on electrical insulators from aqueous solution. The prerequisite in terms of the protein is that the protein forms a geometrically highly-ordered structure in a self-assembling process which can be described by a characteristic dimension (D). In the case of cylindrical structures this means identical diameters and in the case of two-dimensional protein structures identical periodicity of the protein crystal.

Structures thus obtained with characteristic dimensions in the nanometer range display new physical properties and therefore possess a broad field of application. In such cases not only the utilization of specific electrical and magnetic properties is important. The metallic nanostructures are applicable as mechanical components in the field of microsystem engineering. For example, such structures may be used as probes for atomic force microscopy, scanning tunnel microscopy, field emission scanning electron microscopy and field emission transmission electron microscopy.

From US patent 4 911 981 a process for production of microstructures based on lipid structures is known. The possibility of producing field emission cathodes with the lipid tubes produced by this process is explained in detail in US patent 5 089 742. Among the chief disadvantages of these lipid tubes is their dimension. The phosolipid structures described have an outer diameter of 500 nm to 1 μ m, which makes the production of structures with smaller

diameter impossible. Furthermore, a strong spread of the diameters of the filaments produced has been observed. The process described in US patent 4 911 981 is limited only to macromolecular lipid structures which are relatively stable in relation to variation of their surrounding conditions such as temperature and pH. For this reason they can easily be coated from an aqueous solution by direct application of the processes developed for currentless metallizing of insulators/plastics and described in Brenner, A. and Riddell, G., Proc. Am. Electroplaters' Soc., 34, 156, 1947 or in Charles, R., Shipley, Jr., "Historical Highlights of electroless plating", Plating and Surface Finishing, 92-99, 1984. Quite generally the possibility of producing metallic nanostructures based on biological objects is discussed in the study by Douglas, K.; Devaud, G.; Lyon, M.; Clark, N., "Nanostructure fabrication using biomolecular templates", NATO ASI Ser., Ser. C 1183-1191, 1992. In a German patent DE 40 38 887 A1 a process is known for the production of collagen particles as carriers of active principles [drugs]. The construction of nanostructures by external currentless metallizing with electrical or magnetic films/layers is not taken into account here.

The purpose of the invention is therefore to devise metal structures with characteristic structures in the nanometer range.

According to the invention the problem is solved by a metallic nanostructure consisting of a metallized, self-assembled geometrically highly-ordered protein. The protein in this case may be either partially or totally metallized.

The term "geometrically highly-ordered protein" refers to proteins which in the process of self-assembling form highly-ordered two- or three-dimensional structures such as bacterial cell coat [literally, "shell", --Tr.] proteins, collagen, actin and tubulin filaments and DNA strands (deoxyribonucleic acid).

The metallic nanostructures according to the invention with complete metallizing display a homogeneous metal phase into which nucleation centers of another metal are incorporated. In such cases the nucleation centers preferably consist of noble or heavy metals such as gold,

platinum, palladium, titanium or zirconium, and the homogeneous metal phase of nickel or copper or cobalt. The morphologically conforming metal film has a thickness from 1 nm up to the characteristic dimension (D) of the protein. The metal film is electrically conducting, in the case of a nickel or cobalt coating displays magnetic properties and may, in principle, be utilized for further construction of heterostructures (insulators, semiconductors, metals and ceramics).

According to the invention the metallic nanostructures may also display only a partial metallizing. The partial metallizing in this case may consist of a metal phase into which nucleation centers of another metal are incorporated or which consists only of nucleation centers. Preferably in this case the nucleation centers consist of noble or heavy metals such as gold, platinum, palladium, titanium or zirconium and the metal phase of nickel or copper or cobalt.

In an advantageous variant of the invention the self-assembled geometrically highly-ordered protein consists of a structure containing tubulin, preferably microtubuli. Microtubuli are a filamentous structure with an outer diameter of about 25 nm and several micrometers length which occur in the cytoskeleton of eukaryotic cells. The metallized microtubuli, according to the invention, form metallic tubes with a diameter of 30 nm up to 200 nm, depending on how much metal is deposited on the structures containing the tubulin. Partial coating is also possible.

In another advantageous variant of the invention the self-assembled geometrically highly-ordered protein consists of bacterial cell coat [shell] proteins. Bacterial cell coat proteins, also called the S layer or surface layer, are two-dimensional protein crystals which form the outer cell coat layer in many bacteria. This S layer consisting of only one protein or glycoprotein has the ability in vitro to assemble into monomolecular lattices. The unit cell size of the lattice varies, depending on the S layer type, between 10 and 40 nm, said unit cell, depending on the symmetry of the lattice (e.g. quadratic or hexagonal), consisting of several monomers.

The S layers used according to the invention preferably form the basis for a periodical arrangement of metallic particles of diameters between 0.5 and 20 nm, depending on after what

reaction time the process of metal deposition is interrupted. The periodic arrangement of the metallic particles in this case is determined by the symmetry of the S layer, its lattice periodicity and the density of the reactive centers per protein monomer.

According to the invention metallic nanostructures based on self-assembled geometrically highly-ordered proteins are produced by activating assembled highly-ordered proteins with a metal solution and subsequently metallizing them currentlessly in a metallizing bath under conditions tolerable for protein. If only partial metallization is to be performed the activation with one metal solution is sufficient. However it is also possible to apply a limited coat to the activated proteins in a currentless metallizing bath.

In one version of the process according to the invention the highly-ordered proteins can be assembled additionally in vitro. The activation of the proteins according to the invention is accomplished with a noble metal or heavy metal solution, e.g. with a solution containing Au, Pt or Pd ions.

The currentless metallizing is performed according to one variant of the invention with a Ni or Cu or Co metallizing bath based on dimethylaminoborane as the reducing agent and Ni or Cu or Co salts. Advantageously hypophosphite may also be used as a reducing agent.

In a preferred variant of the invention microtubuli are metallized. Their isolation and purification is described in Shelanski, M.; Gaskin, F.; Cantor, C., "Microtubule assembly in the absence of added nucleotides", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 765-768, 1973 and Vater, W.; Bohm, K.; Unger, E., "Effects of DNA on the taxo[l-]stimulated in vitro assembly of microtubule protein from porcine brain", Studio Biophys. 97, 47-60, 1983 in detail. The microtubuli are assembled in vitro with GTP (guanosine-5'-triphosphate trisodium salt monohydrate) and taxol (from *Taxus brevifolia*) at 37°C and essentially separated from the unassembled protein.

The activation of the assembled microtubuli according to the invention is accomplished by adding a saturated Pd acetate solution to the assembled microtubuli and guiding this solution onto the surface of the microtubuli to form Pd nuclei. Advantageously in this process besides the

adsorption of the Pd particles formed in the activation solution on the surface of the microtubuli the ability of the tubulin-structure-forming amino acid groups to reduce Pd^{2+} into Pd^0 is exploited. In this process on the surface of the microtubuli Pd clusters are formed whose size and distribution depends on the length of the activation process. In the case of an average cluster size of 2 nm also an activation of the inner surface of the microtubuli is possible.

Advantageously the activation process is conducted for a duration of 2 h. The activated microtubuli are subsequently separated from the activation solution, washed and transferred to a buffer solution.

The activation is followed by the actual metallizing itself. The most common metallizing bath for copper and nickel operate at temperatures above 60°C and at a pH greater than 8 (see Charles R., Shipley, Jr., "Historical Highlights of electroless plating", Plating and Surface Finishing, 92-99, 1984 and Lang, K., "Die stromlose Vernickelung", Galvanotechnik No. 6, 347-358, 1965). In order to achieve currentless coating on the activated protein structures, however, the coating conditions must be adapted to the very sensitive assembling conditions of the protein structures so that during the metallizing the biomolecular template does not decompose and its morphology is not substantially disturbed.

The activated microtubuli present in vitro are mixed with a Ni bath based on dimethylaminoborane as reducing agent and Ni acetate or Ni sulfate as the metal salts to be reduced. From this solution after a duration of ca. 1 min the metallized microtubuli precipitate out. The deposited nickel film is closed on the microtubuli at a film thickness of around 10 nm and besides electrical also displays magnetic properties. The thickness of the metal films produced which can be deposited at a pH between 6.2 and 7.0 and temperatures between 22 and 37°C depends on the duration of the metallizing process. Besides very thin metal films (thickness about 10 nm) films of several 100 nm film thickness can be realized on the surface of the microtubuli, in which case the initial morphology of the individual microtubuli remains preserved.

Due to the fact that the microtubuli used have a very small diameter of 25 nm it is possible to produce metallic tubes having a diameter of 35 nm to a few 100 nm, depending on how much metal is deposited on the microtubuli. Since the microtubuli used are of the same diameter, between the individual metallized structures there are no differences in terms of diameter, resulting in identical electrical and magnetic properties. Furthermore, the microtubuli have a length of several micrometers and therefore a large aspect ratio (length:width). This makes them especially suitable for applications in which involve the positioning and fixation of the metal tubes.

The process described for activating and metallizing is not tubulin specific. It may also be used on the other protein structures according to the invention.

The activation of the proteins can also be accomplished according to another version of the process of the invention by mixing the S layer obtained, e.g., after cleaning, of *Sporosarcina ureae* either with K_2PtCl_4 solution or by recrystallizing the S layer in advance as described in Pum, D.; Weinhandl, M.; Hodl, C.; Sleytr, U., "Large Scale recrystallization of the S layer of *Bacillus coagulans* E38-66 at the air/water interface and on lipid films", J. Bacteriology, May 2762-2766, 1993, on an interface and subsequently replacing the subphase of the recrystallization solution by a K_2PtCl_4 solution. Depending on the duration of the reaction time Pt clusters will form on the surface of the S layer. Advantageously in this process of Pt^{2+} reduction into Pt^0 , besides the reducing effect of certain amino acids and the reduction of the Pt salts by additives contained in the solution such as NaN_3 reported in the case of activation of the microtubuli, the specific absorption of the Pt cluster may be utilized because of the pronounced charge distribution on the S layer.

The regular arrangements of Pt clusters thus obtained with a size of 1-2 nm are interesting above all as regards the application of the catalytic activity of the deposited clusters. In addition also as reported in the example of embodiment for metallizing the microtubuli a continuous metal

film can be deposited by currentless metallizing.

The invention will be explained in more detail with reference to the following examples of embodiment and the attached illustrations in which

Figure 1 shows SEM photographs of metallized microtubuli

Figure 2 shows TEM photographs of activated S layer of *Sporosarcina ureae*

Example 1

The production of two-dimensional metal structures based on microtubuli templates is described. First of all the microtubuli are assembled as follows:

The isolation and purification of tubulin is described in Shelanski, M.; Gaskin, F.; Cantor, C., "Microtubule assembly in the absence of added nucleotides", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 765-768, 1973 and Vater, W.; Bohm, K.; Unger, E., "Effects of DNA on the taxol-stimulated in vitro assembly of microtubule protein from porcine brain", Studio Biophys. 97, 47-60, 1983 in detail. The assembly of the microtubuli from a tubulin preparation with a concentration of 1 mg/ml tubulin takes place in a buffer solution of 500 mM MES (2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate), 1 mM EGTA (ethyleneglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetra-acetic acid) and 0.5. mM $MgCl_2$ by adding 0.25 mM GTP and 10^{-6} M taxol at a temperature of $37^{\circ}C$. In order to monitor the assembly the clouding/turbidity of the assembling solution is recorded with a spectrometer at a wavelength of 350 nm until a saturation is observed. After this the solution is centrifuged at 14000 revolutions per minute for 30 minutes in order to separate the assembled microtubuli and the unassembled protein. The bottom precipitate thus obtained is transferred back to an MES buffer at pH 6.8. The preparation thus obtained is the starting point for all further activation and metallization steps.

A volume of 300 μ l of this solution with the assembled microtubuli is mixed with an equal volume of a saturated palladium acetate solution for the purpose of activating the microtubuli surface. In the activation process this solution is allowed to stand until a sufficient

number of Pd nuclei has formed on the microtubuli (ca. 2 h). Then the activated microtubuli are washed twice with MES buffer, using a 300 kDa membrane filter. The residue collected in the membrane filter is transferred to 500 μ l of MES buffer.

When this sample was examined in the transmission electron microscope the addition of black particles to the surface of the microtubuli was clearly visible. The diameter of the particles in the case of two hours of activation was about 2 nm. Here it must be noted that it is not essential for the coating process whether the attached palladium clusters are present in already reduced form or still as Pd²⁺ ions which only then are reduced in the starting phase of the metallizing in the dimethylaminoborane bath. The composition of these clusters was determined with an energy-dispersive x-ray microregion analyzer, which indicated that they consist to 99% of palladium.

The microtubuli was obtained with Pd⁰ or Pd²⁺ clusters on the surface can be coated currentlessly. For this purpose a nickel bath of the following composition is used:

50 g/l Ni(CH₃COO)₂•6H₂O

25 g/l sodium citrate

25 g/l 85% lactic acid

2.5 g/l dimethylaminoborane.

The pH of this metallizing bath is adjusted to a value of 6.8 with NH₄OH.

500 μ l of the solution with the activated microtubuli are mixed with an equal quantity of the above described metallizing bath. After about 1 minute black particles precipitate out of this solution which represent metallized microtubuli. The continuing metallizing process can be interrupted by strong dilution of the solution with MES buffer. In this way microtubuli with different metal film thicknesses can be generated.

The nickel-metalplated microtubuli were studied in the transmission electron microscope and scanning electron microscope at an accelerating voltage of 1 kV. The corresponding photograph is shown in Figure 1. The deposited Ni particles possess a size of about 8-10 nm

which form a closed electrically conducting film at a film thickness above 10 nm. It is apparent that the metallizing begins only at sites on the microtubuli occupied by Pd nuclei. This means that deposition of nickel from the metallizing solution is possible only after activation of the microtubuli surface with catalyst nuclei.

The magnetic character of the nickel coating could be demonstrated by manipulation of the metallized microtubuli in aqueous solution using an electromagnetic field and by magnetic scanning power microscopy.

Example 2

The assembling of the microtubuli and their activation is conducted as described in example 1. As opposed to example 1, nickel is deposited from a nickel sulfate complex. The composition of the metallizing bath is as follows:

39.4 g/l $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

20 g/l sodium citrate

10 g/l 85% lactic acid

4 g/l dimethylaminoborane.

The pH adjustment of 6.8 was also achieved with NH_4OH . The rates of deposition of this bath are of the same order of magnitude as those of the bath in example 1 so that the coating of about 1 min duration is sufficient to generate a continuous Ni film on the microtubuli.

The magnetic character of the nickel coating could be demonstrated as described in example 1.

Example 3

The assembling of the microtubuli and their activation is conducted as described in example 1. As opposed to example 1, instead of nickel a cobalt film is deposited on the activated

microtubuli. The composition of the metallizing bath is as follows:

25 g/l $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

25 g/l succinic acid

4 g/l dimethylaminoborane.

The pH of the bath is adjusted to 6.8 with NH_4OH . The rate of deposition of this bath about a factor of 2 lower than the rates of deposition of the Ni baths so that a coating duration of about 2 minutes suffices to generate a continuous Co film on the microtubuli.

The magnetic character of the cobalt coating could be demonstrated as described in example 1.

Example 4

The microtubuli were assembled as described in example 1.

For the purpose of activating the microtubuli surface a volume of 300 μl of assembled microtubuli were mixed with a 3 mM solution of K_2PtCl_4 or a 3 mM solution of Na_2PdCl_4 . The total volume of the activation solution was brought to 1000 μl with MES buffer. In the activation process this solution was allowed to stand until a sufficient number of Pt or Pd nuclei had formed on the microtubuli (ca. 2 h). Then the microtubuli were filtered as described in example 1.

The subsequent metallization was performed in the same manner as in example 1.

Example 5

The production of a two-dimensional regular arrangement of Pt clusters on the surface of the S layer protein of *Sporosarcina ureae* is described.

The isolation and purification of the S layer protein is described in Engelhard, H.; Saxton, W.; Baumeister, W., "Three-dimensional structure of the tetragonal surface layer of *Sporosarcina ureae*", J. Bacteriology, Oct. 309-317, 1986. The S layer sheets thus obtained were placed in a

50 mM phosphate buffer solution (pH 7.8) with 1 mM MgCl₂ at 4°C. To suppress the growth of bacteria in the protein solution and as an additional reducing agent for the activation reaction an addition of 3 mM NaN₃ was found to be helpful. This S layer solution with a protein concentration of 10 mg/ml was the starting point for all further activation steps.

A volume of 30 μ l of this protein solution was mixed with a 3 mM K₂PtCl₄ solution which was prepared one day in advance. The total volume of the activation solution was 1 ml, the activation solution was allowed to stand for 24 h until a sufficient number of Pt clusters had formed on the S layer surface. Then the activated S layer was washed with phosphate buffer using a 300 kDa membrane. The residue produced in the membrane filter was transferred to 500 μ l of phosphate buffer.

To study the samples the activated S layer was immobilized on a transmission electron microscope grid. The transmission electron microphotograph in Figure 2 clearly shows the deposition of Pt clusters with an average diameter of 1.5 nm. One also clearly recognizes the periodical arrangement of the Pt clusters which are oriented according to the multiple symmetry of the S layer of *Sporosarcina ureae*. The average spacing between the Pt clusters of about 3 nm permits the conclusion that 4 Pt clusters were deposited per unit cell. The chemical composition of the deposited clusters was determined by energy-dispersive x-ray microregion analysis as 99% platinum.

Claims

1. Metallic nanostructure consisting of a metallized self-assembled geometrically highly-ordered protein.
2. Metallic nanostructure as in claim 1 characterized by the fact that the self-assembled highly-ordered protein is partially or completely metallized.
3. Metallic nanostructure as in claims 1 or 2, characterized by the fact that the self-

assembled highly-ordered protein is a tubulin-containing structure or the bacterial cell protein or a collagen or an actin filament or a DNA strand.

4. Metallic nanostructure as in claim 3 characterized by the fact that the self-assembled highly-ordered protein is a microtubule.

5. Metallic nanostructure as in claim 4 characterized by the fact that the self-assembled highly-ordered protein is an S layer.

6. Metallic nanostructure as in claim 5, characterized by the fact that the self-assembled highly-ordered protein is an S layer of *Sporosarcina ureae*.

7. Metallic nanostructure as in claim 2, characterized by the fact that the self-assembled highly-ordered proteins with complete metallization display a metallization from a homogeneous metal phase into which nucleation centers of another metal are embedded.

8. Metallic nanostructure as in claim 2, characterized by the fact that the self assembled geometrically highly-ordered proteins with partial metallization display a metallization from a metal phase in which nucleation centers of another metal are embedded or [are] nucleation centers of a metal.

9. Metallic nanostructure as in claims 6 and 7 characterized by the fact that the nucleation centers consist of noble metals or heavy metals and the metal phase of copper or nickel or cobalt.

10. Process for production of metallic nanostructures based on self-assembled geometrically highly-ordered proteins characterized by the fact that the proteins are activated with a metal solution and subsequently metallized currentlessly in a metallizing bath under conditions tolerable for protein.

11. Process as in claim 10 characterized by the fact that tubulin-containing structures or bacterial cell coat proteins or collagen or actin filaments or DNA strands are used as the self assembled geometrically highly-ordered proteins.

12. Process as in claim 11 characterized by the fact that microtubuli or S layer are used as the self assembled geometrically highly-ordered proteins.

13. Process as in claim 11 characterized by the fact that S layers from *Sporosarcina ureae* are used as the self-assembled geometrically highly-ordered proteins.

14. Process as in claim 11 characterized by the fact that the self-assembled geometrically highly-ordered proteins are additionally assembled in vitro before activation.

15. Process as in claim 10 characterized by the fact that the proteins are activated with a noble metal or heavy metal solution.

16. Process as in claim 10 characterized by the fact that the proteins are activated with a palladium or platinum salt solution.

17. Process as in claim 10 characterized by the fact that the proteins are activated with a saturated palladium acetate solution or a K_2PtCl_4 or a Na_2PdCl_4 solution.

18. Process as in claim 10 characterized by the fact that the metallizing is accomplished with a metallizing bath based on dimethylaminoborane as a reducing agent and nickel or copper or cobalt salts.

19. Process as in claim 10 characterized by the fact that the metallizing is accomplished with a metallizing bath by using hypophosphite as the reducing agent.

20. Process as in claim 10 characterized by the fact that in order to produce metallic nanostructures with partial metallization the proteins are activated with a metal solution.

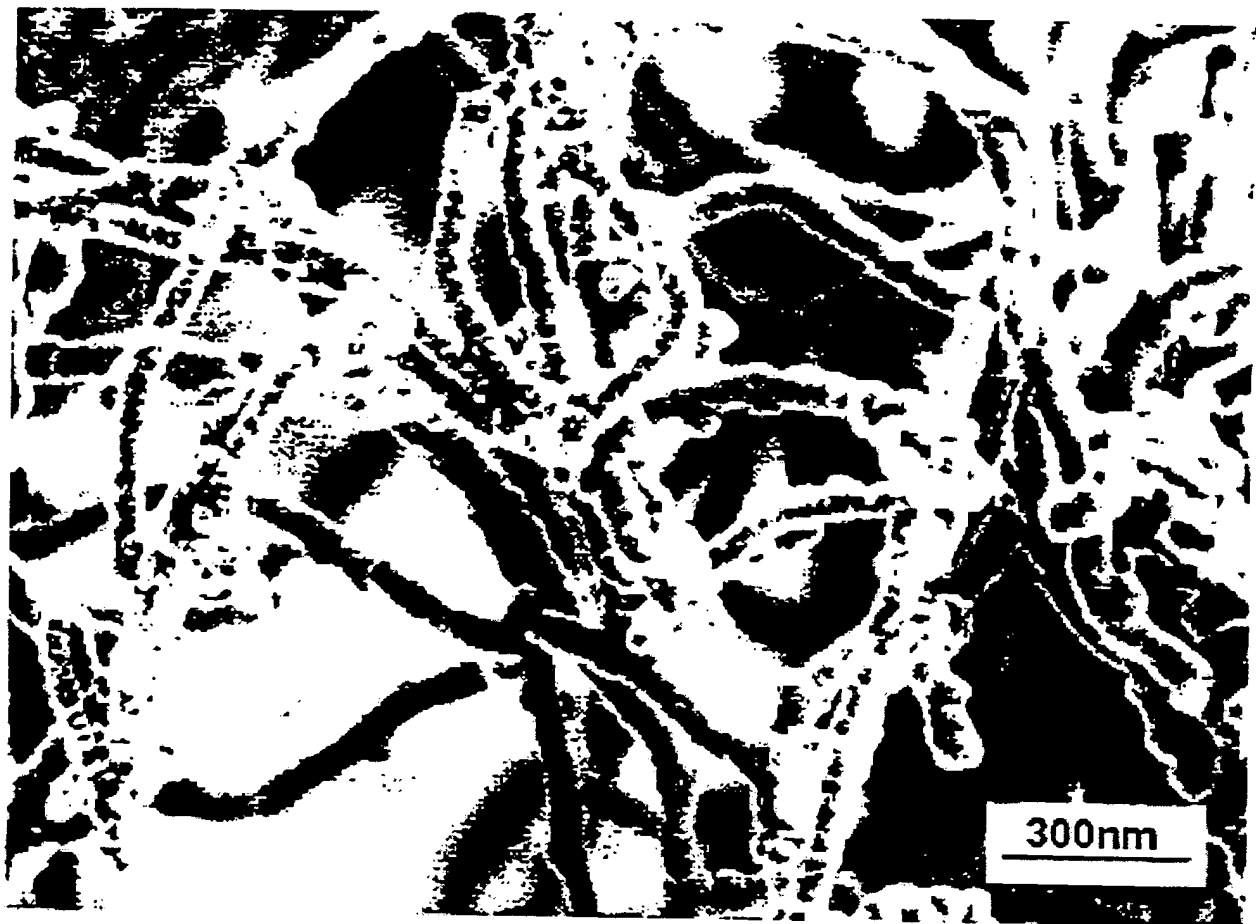


Figure 1



Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 97/01236

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶: C23C 18/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶: C23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4911981 A (SCHNUR et al.), 27 March 1990 (27.03.90) the whole document (mentioned in the description). ---	1-20
A	Chem. abstr., Band 118, N° 10, 08 March 1993 (08.03.93) (Columbus, Ohio, USA), page 777, column 2, abstract 9192u, DOUGLAS, K. et al. "Nanostructure fabrication using biomolecular templates", NATO ASI Ser., Ser. C 1992, 374(Phys. Chem. Finite Syst.: Clusters Cryst., Vol 2) 1183-91 (Eng). ---	1-20
A	Chem. abstr., Band 118, N° 18, 03 Mai 1993 (03.05.93) (Columbus, Ohio, USA), page 865, column 1, abstract 181227c, DEVAUD, G. et al. "Microstructural modification by fast atom beam milling of nanotextured ultrathin metal films", J. Vac. Sci. Technol., B 1993, 11(1), 32-6 (Eng).	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date
"T" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each contribution being relevant to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 October 1997 (07.10.97)

Date of mailing of the international search report

05 November 1997 (05.11.97)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

ANHANG

zum Internationalen Recherchen-
bericht über die internationale
Patentanmeldung Nr.

ANNEX

to the International Search
Report to the International Patent
Application No.

ANNEXE

au rapport de recherche inter-
national relatif à la demande de brevet
international n°

PCT/DE 97/01236 BAE 165348

In diesem Anhang sind die Mitglieder
der Patentfamilien der im obenge-
nannten internationalen Recherchenbericht
angeführten Patentdokumente angegeben.
Diese Angaben dienen nur zur Unter-
richtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family
members relating to the patent documents
cited in the above-mentioned inter-
national search report. The Office is
in no way liable for these particulars
which are given merely for the purpose
of information.

La présente annexe indique les
membres de la famille de brevets
relatifs aux documents de brevets cités
dans le rapport de recherche inter-
national visé ci-dessus. Les renseigne-
ments fournis sont donnés à titre indica-
tif et n'engagent pas la responsabilité
de l'Office.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication	Mitglied(er) der Patentfamilie Patent family member(s) Membre(s) de la famille de brevets	Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication
US A 4911981	27-03-90	keine - none - rien	

Translation:
Language Services Unit
ChemTek Translations, Inc.
January 3, 2002

WO 97/48837